

VU Research Portal

Neuroadaptations underlying relapse to heroin seeking

van den Oever, M.C.

2008

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van den Oever, M. C. (2008). *Neuroadaptations underlying relapse to heroin seeking*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

•

Neuroplasticiteit ten grondslag aan heroïne verslaving



Foto: Tycho Jonker

Drugsverslaving is een psychiatrische stoornis met grote gezondheidsrisico's voor de verslaafde en heeft daarnaast enorme financiële consequenties voor de maatschappij op het gebied van gezondheidszorg en criminaliteitsbestrijding. Een intrigerend fenomeen dat het behandelen van drugsverslaving bemoeilijkt, is dat ex-drugsverslaafden een langdurige of misschien zelfs permanente kwetsbaarheid behouden waardoor zij gemakkelijk terugvallen in hun oude gewoonte van drugsgebruik. Helaas zijn bestaande farmacotherapieën niet doeltreffend genoeg om terugval te kunnen voorkomen. Tijdens drugsgebruik worden neutrale voorwerpen en omgevingsfactoren geassocieerd met het belonende effect van de drug en krijgen daardoor een hoge motivationele waarde toegekend. Confrontatie met deze drugs-geassocieerde cues tijdens perioden van onthouding roept gevoelens van hunkering op naar de drug en wordt gezien als een belangrijke aanleiding voor terugval. Het is daarom van groot belang om onderzoek te doen naar de neurobiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan cue-geïnduceerde terugval naar drugsgebruik. Een beter inzicht in deze mechanismen zal een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan de ontwikkeling van effectieve farmacotherapie.

De langdurige aard van cue-geïnduceerde terugval suggereert dat drugsgebruik gepaard gaat met persistente cellulaire en moleculaire veranderingen in hersengebieden (neuroadaptaties) die betrokken zijn bij het verwerken en opslaan van associaties tussen omgevingsfactoren en het belonende effect van de verslavende stof. Echter, het gebruik van cellulaire en moleculaire technieken om onderzoek te doen naar neuroadaptaties is om ethische redenen bij mensen vaak niet mogelijk. Diermodellen die terugval naar drugs zoekgedrag nabootsen bieden hierbij uitkomst. Een veel gebruikt diermodel om drugsverslaving te bestuderen is het zogenaamde drug zelftoediening model. In dit model worden dieren beloond met een intraveneuze injectie van een verslavende stof na het maken van een instrumentele respons. Terugval naar drug zoekgedrag (het maken van instrumentele responsies) kan worden bestudeerd door dieren opnieuw bloot te stellen aan drugs-geassocieerde cues na een periode van drug onthouding. Met dit model is eerder aangetoond dat neuroadaptaties als gevolg van drugsgebruik gebruik maken van mechanismen van synaptische plasticiteit,

zoals lange termijn potentiatie en depressie (respectievelijk LTP en LTD), die ook betrokken zijn bij leren en geheugen. Onderzoek naar moleculaire en cellulaire adaptaties die plaatsvinden op het niveau van de synaps wordt daarom veelbelovend geacht voor het achterhalen van de neurobiologische oorzaak van verslaving.

Eén van de hersengebieden die een belangrijke rol speelt bij cue-geïnduceerde terugval is de mediale prefrontale cortex (mPFC). Uit eerder onderzoek is gebleken dat cue-geïnduceerd heroïne zoekgedrag, maar niet zoekgedrag naar de natuurlijke beloning suiker, gepaard gaat met verhoogde neuronale activiteit in de mPFC van de rat. Bovendien is gevonden dat het tijdelijk farmacologisch inactiveren van een subgebied van de mPFC, het prelimbisch gebied, resulteert in een toename van heroïne zoekgedrag na blootstelling aan heroïne-geassocieerde stimuli. Dit maakt het aannemelijk dat de mPFC een neuronaal substraat is voor door heroïne-geïnduceerde neuroadaptaties, echter, bewijs voor adaptaties op het niveau van de synaps werd tot nog toe niet gevonden. In dit proefschrift heb ik mij gericht op lange termijn adaptaties in de eiwit samenstelling van de synaps, het synaptische proteoom, als gevolg van heroïne zelftoediening (hoofdstuk 3) en zelftoediening van een natuurlijke beloning (hoofdstuk 2) bij ratten. Daarnaast heb ik acute veranderingen onderzocht die plaatsvonden in het synaptisch proteoom van de mPFC na blootstelling aan heroïne-geassocieerde cues (hoofdstuk 4).

Hoofdstuk 2

Om meer inzicht te krijgen in de neurobiologie van drugsverslaving is het belangrijk om onderzoek te doen naar neuroadaptaties die ten grondslag liggen aan het leren en geheugen gerelateerd aan natuurlijke beloningen (bijvoorbeeld voedsel). Hoewel verscheidene studies zelftoediening van een natuurlijke beloning (zoals suiker) als controle conditie hebben gebruikt om de effecten van drug zelftoediening te analyseren, is het niet bekend of zelftoediening van een natuurlijke beloning op zichzelf resulteert in lange termijn adaptaties. Daartoe heb ik het effect van suiker zelftoediening op eiwit expressie in de mPFC onderzocht met behulp van tweedimensionale gel-electroforese (2-D PAGE) en MALDI-TOF massaspectrometrie drie

weken na suiker zelftoediening. Als controle conditie werden dieren gebruikt die blootgesteld werden aan de zelftoediening-omgeving, maar werden vervolgens niet beloond met suiker na het maken van een instrumentele respons. Hierbij werd gevonden dat suiker zelftoediening inderdaad leidt tot lange termijn adaptaties in eiwit expressie, en wel in eiwitten die betrokken zijn bij organisatie van het cytoskelet, energie metabolisme, oxidatieve stress, neurotransmissie en neuronale uitgroei en differentiatie. Bovendien correleerde een deel van deze veranderingen met adaptaties op gen-expressie niveau. Op basis van de functie van een groot aantal van de door suiker zelftoediening gereguleerde eiwitten, vermoeden wij dat deze veranderingen duiden op aanpassingen in de organisatie van neuronale verbindingen en de morfologie van neuronen in de mPFC. Daarnaast is bekend dat een substantieel deel van de gereguleerde eiwitten voornamelijk in de synaps voorkomt, dat kan duiden op veranderingen in neurotransmitter afgifte in de mPFC. Vervolg studies zijn echter noodzakelijk om te onderzoeken of de gevonden moleculaire adaptaties functionele consequenties hebben met betrekking tot suiker zoekgedrag en hoe deze zich verhouden met veranderingen na zelftoediening van verslavende stoffen. De resultaten laten zien dat zelftoediening van een natuurlijke beloning resulteert in persistente neuroadaptaties in de mPFC en dat additionele controle groepen (bijvoorbeeld saline zelftoediening) noodzakelijk zijn om de specifieke effecten van verslavende stoffen te bestuderen. Ondanks dat de methode van eiwitzuivering zoals gebruikt in deze studie voornamelijk de identificatie van eiwitten toelaat die in hoge mate tot expressie komen in de cel, vonden wij dat suiker zelftoediening leidt tot veranderingen in de expressie van specifiek synaptisch gelokaliseerde eiwitten. Dit is een aanwijzing dat zelftoediening van een natuurlijke beloning mogelijk persistente veranderingen teweeg brengt in het functioneren van synapsen in de mPFC en het geeft aan dat een gerichte studie naar veranderingen in het synaptische proteoom van de mPFC wenselijk is om meer inzicht te krijgen in het proces van geheugenvorming gerelateerd aan natuurlijke beloningen en verslavende stoffen.

Hoofdstuk 3

Vervolgens testte ik de hypothese dat heroïne zelftoediening resulteert in persistente adaptaties in het synaptische proteoom van de mPFC gebruik makend van ‘iTRAQ proteomics technologie’. iTRAQ proteomics is een zeer gevoelige techniek die het mogelijk maakt om subtiele veranderingen in eiwit expressie te kwantificeren. Drie weken na zelftoediening van heroïne werden synaptische membraan eiwitten gezuiverd uit de mPFC met behulp van sucrose gradiënten waarna de peptide fragmenten van deze eiwitten gelabeld en vervolgens gekwantificeerd werden met iTRAQ. Hierbij ontdekte ik dat heroïne zelftoediening veranderingen aanbrengt in eiwitten betrokken bij celadhesie, signaal transductie, neuronale uitgroei, neurotransmitter afgifte en energie metabolisme, maar één van de meest opvallende veranderingen betrof een groep eiwitten die in zeer hoge dichtheid voorkomen in een specialisatie van de extracellulaire matrix, zogenaamde ‘perineuronale netten’ (PNNs). PNNs zijn netvormige structuren die zich bevinden rondom het cellichaam, dendrieten en synapsen van een subgroep van neuronen in het brein, waar ze mogelijk een belangrijke rol vervullen met betrekking tot structurele plasticiteit, presentatie van groei factoren, neurotransmitter afgifte en als fysieke barrière die de synaps isoleert. iTRAQ proteomics toonde aan dat deze veranderingen specifiek plaatsvinden rond de synaps. PNNs in de mPFC bleken zich uitsluitend te bevinden rondom GABAerge interneuronen, hetgeen kan duiden op een adaptatie in de structurele stabiliteit of fysiologische eigenschappen van synapsen op GABAerge interneuronen. Bovendien is bekend dat enzymatische afbraak van PNNs resulteert in verhoogde exciteerbaarheid van GABAerge interneuronen, maar niet van piramidaal cellen. Dit bracht ons er toe om te onderzoeken of GABAerge neurotransmissie veranderd in de mPFC na onthouding van heroïne zelftoediening en wat de invloed van heroïne-geassocieerde cues is op de afgifte van GABA. Dit werd gemeten aan de hand van inhibitoire post-synaptische stroom (IPSC) in piramidaal cellen in de mPFC, omdat bekend is dat GABAerge interneuronen in de mPFC sterke invloed uitoefenen op de exciteerbaarheid van piramidaal cellen. Heroïne zelftoediening bleek geen lange termijn effect te hebben op IPSCs gemeten in piramidaal cellen.

Daarentegen, blootstelling aan heroïne-geassocieerde cues na een periode van onthouding resulteerde in een verdubbeling van de frequentie van IPSCs, dat impliceert dat heroïne zoekgedrag gepaard gaat met een sterke toename van GABAerge transmissie en daardoor inhibitie van piramidaal cellen in de mPFC. Samengevat, deze resultaten suggereren dat de responsiviteit van GABAerge interneuronen voor heroïne-geassocieerde cues langdurig verhoogd blijft tijdens onthouding, mogelijk veroorzaakt door afbraak van PNNs rondom de synapsen van dit type zenuwcellen in de mPFC. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of dit laatste daadwerkelijk het geval is. Daarnaast is het belangrijk om te onderzoeken of adaptaties in PNNs specifiek zijn voor heroïne zelftoediening of dat deze ook plaatsvinden na zelftoediening van een natuurlijke beloning, omdat ze mogelijk het gevolg zijn van het leer en geheugen proces dat gepaard gaat met algemeen motivationeel gedrag.

Hoofdstuk 4

Synaptische plasticiteit komt onder andere tot stand door snelle veranderingen in de eiwit samenstelling van het synaptische membraan. Op basis van bovengenoemde bevindingen is het aannemelijk dat adaptaties plaatsvinden gedurende cue-geïnduceerd heroïne zoekgedrag. Om dit te onderzoeken isoleerde ik synaptische membraan eiwitten uit de mPFC van ratten direct na blootstelling aan heroïne-geassocieerde cues. Met behulp van iTRAQ proteomics technologie werden deze eiwitten geïdentificeerd en gekwantificeerd. Hierbij werd gevonden dat cue-geïnduceerd heroïne zoekgedrag resulteert in een afname van subunits van het AMPA type glutamaat receptor en een toename van een eiwit genaamd AP2, dat clatrine-gemedieerde endocytose van onder andere AMPA receptor subunits reguleert. Uit eerdere studies is gebleken dat clatrine-gemedieerde endocytose van AMPA receptoren kan leiden tot LTD van synapsen in de hippocampus en nucleus accumbens. Dit bracht ons er toe om te onderzoeken of de door ons gevonden afname van AMPA receptor subunits gepaard gaat met een verandering van sterkte in synaptische transmissie in de mPFC. Daartoe werd de stroom door AMPA en NMDA receptoren op piramidaal cellen in de mPFC gemeten na blootstelling aan heroïne-

geassocieerde cues. In overeenstemming met de afname van AMPA receptor subunits vonden wij een reductie in de verhouding tussen AMPA en NMDA stroom door piramidaal cellen die specifiek veroorzaakt werd door een verandering in de AMPA stroom. Om de causaliteit van deze bevindingen met betrekking tot terugval naar heroïne zoekgedrag aan te tonen, werden ratten met een synthetisch peptide geïnjecteerd dat specifiek clatrine-gemedieerde endocytose van AMPA receptoren blokkeert. Zowel een intraveneuze injectie van dit peptide als een injectie direct in de ventrale, maar niet dorsale mPFC, resulteerde in een significante vermindering van heroïne zoekgedrag na blootstelling aan heroïne-geassocieerde cues. Bovendien vonden wij dat injectie van ditzelfde peptide geen effect heeft op cue-geïnduceerde terugval naar suiker zoekgedrag, hetgeen aantoont dat AMPA receptor endocytose specifiek heroïne zoekgedrag reguleert. Samengevat laten wij zien dat depressie van glutamaterge synapsen op piramidaal cellen in de ventrale mPFC een cruciaal mechanisme is in cue-geïnduceerde terugval naar heroïne zoekgedrag.

Conclusie

In overeenstemming met de opvatting dat drugsverslaving gepaard gaat met veranderingen in synaptische plasticiteit, vonden wij dat onthouding van heroïne zelftoediening resulteert in persistente adaptaties in de eiwit compositie van synapsen in de mPFC. Opmerkelijk is de afname van een groep eiwitten die verantwoordelijk is voor de opbouw van PNNs in de mPFC en de mogelijk daarmee samenhangende verhoogde responsiviteit van GABAerge interneuronen voor heroïne-geassocieerde cues. Daarnaast heb ik laten zien dat terugval naar heroïne zoekgedrag gepaard met zeer snelle veranderingen in het synaptische proteoom van de mPFC, wat resulteert in AMPA receptor afhankelijke depressie van synapsen op piramidaal cellen. Op basis van deze veranderingen concludeer ik dat de exciteerbaarheid van piramidaal cellen in de mPFC gedurende cue-geïnduceerd heroïne zoekgedrag drastisch afneemt door een toename en afname in respectievelijk GABAerge en glutamaterge neurotransmissie. Het is zeer aannemelijk dat de afname in exciteerbaarheid van piramidaal cellen

in de mPFC leidt tot een reductie in de activiteit van piramidale cellen en daardoor een vermindering van glutamaat afgifte in projectiegebieden van de mPFC. Uit voorgaande studies is bekend dat piramidale cellen in de mPFC projecteren naar neuronen in de nucleus accumbens, amygdala, en het ventrale tegmentum; hersengebieden die een belangrijke rol spelen bij cue-geïnduceerd heroïne zoekgedrag. Vervolgstudies zullen moeten uitwijzen of terugval naar heroïne zoekgedrag inderdaad gepaard gaat met een afname van glutamaterge neurotransmissie vanuit de mPFC naar deze of andere hersengebieden. Daarnaast is het belangrijk om te onderzoeken of de door ons gevonden neuroadaptaties ook een rol spelen bij cue-geïnduceerde terugval naar zoekgedrag van andere verslavende stoffen zoals cocaïne of nicotine.

Als we aannemen dat de neurobiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan terugval naar heroïne zoekgedrag in ratten vergelijkbaar zijn met de mechanismen die terugval veroorzaken in mensen, dan zouden onze bevindingen een startpunt kunnen zijn voor de ontwikkeling van farmacotherapiën die de klinische behandeling van heroïne verslaving, in het bijzonder het aspect van terugval, bevorderen. De door GABA gereguleerde inhibitie van piramidale cellen zou bijvoorbeeld kunnen worden voorkomen met behulp van GABA receptor antagonist. Echter, gezien de zeer diverse rol van GABA in het centrale zenuwstelsel zou de aanwezigheid van GABA receptor antagonist in andere gebieden dan de mPFC voor zeer nadelige bijwerkingen kunnen zorgen. De cue-geïnduceerde endocytose van AMPA receptoren is mogelijk een specifiek mechanisme dat voorkomen kan worden zonder grote nadelige bijwerkingen. Een aanwijzing hiervoor is dat zoekgedrag naar een natuurlijke beloning zoals suiker niet beïnvloedt wordt door inhibitie van AMPA receptor endocytose met behulp van het door ons gebruikte synthetische peptide. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of dit peptide daadwerkelijk in staat is om het risico op terugval naar drugs gebruik tijdens perioden van drugs onthouding te verminderen.

Ook laten de experimenten beschreven in dit proefschrift zien dat het gebruik van proteomics technologie een gidsfunctie kan hebben om veranderingen op het niveau van het synaptische proteoom te ontdekken,

hetgeen van grote waarde is voor het identificeren van neuroadaptaties, bijvoorbeeld die causaal betrokken zijn bij verslavingsgedrag. De hier beschreven reductie in exciteerbaarheid van piramidale cellen in de mPFC tijdens cue-geïnduceerde terugval naar heroïne zoekgedrag geeft aanleiding om het neuronale circuit dat betrokken is bij dit gedrag nader te onderzoeken.